

学 位 論 文 要 旨

氏 名 秋谷 昌史



論 文 題 目

卵巣明細胞腺癌の分子マーカーとしての LEFTY の同定とその機能解析

指 導 教 授 承 認 印

三 枝 信



卵巣明細胞腺癌の分子マーカーとしての LEFTY の同定とその機能解析

秋谷 昌史

[緒言]

卵巣癌 (ovarian carcinoma: OvCa) は、漿液性腺癌 (serous adenocarcinoma: OSeCa)、粘液性腺癌 (mucinous adenocarcinoma: OMuCa)、類内膜腺癌 (endometrioid adenocarcinoma: OEmCa)、明細胞腺癌 (ovarian clear cell carcinoma: OCCCa) の 4 型に分けられ、極めて予後不良な悪性腫瘍である。OvCa の最も有効な化学治療法はシスプラチンなどの白金製剤をベースとしたものであるが、OCCCa は往々にして薬剤抵抗性であり、進行期の癌は他の組織型に比べて治療成績が不良である。

LEFTY (left-right determination factor) は、TGF- β スーパーファミリーに属し、マウスでは lefty1, lefty2、ヒトでは LEFTY1, LEFTY2 の isoforms がある。LEFTY は、TGF- β 受容体活性化のあと起こる Smad2 のリン酸化を抑制し、その下流である receptor (R)-Smad のリン酸化、R-Smad/Smad4 の二量体化およびその核内移行を抑制する。

本研究は、ショットガンプロテオミクス法で OCCCa と non-OCCCa とのタンパク質発現の相違を網羅的に検索し、OCCCa において、LEFTY の発現が mRNA、タンパク質レベルにおいて、non-OCCCa と比較して顕著に高発現していることを見出した。さらに、LEFTY の機能解析を行い、TGF- β /Smad 経路と OCCCa との関連性を検索した。

[結果]

臨床検体における OvCa のショットガンプロテオミクス法による解析

我々は、OCCCa と non-OCCCa の分子発現の相違を明確にするため、ホルマリン固定パラフィン切片 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 検体を用い、ショットガンプロテオミクスを行った。合計 5382 種類のタンパク質が、16 症例の OvCa で見出され、これらのうち OCCCa の 4 症例すべてに共通で発現し、non-OCCCa 症例では発現が見られなかったタンパク質は 52 種類あった。このうち、最も高発現を示した LEFTY1 と LEFTY2 タンパク質に注目した。

OCCCa において、LEFTY の発現は増加している

OvCa の 4 つの組織型について免疫染色を施行した。LEFTY の immunohistochemistry (IHC) score の平均値は OCCCa で最も高かった。同様の結果は、western blot 法による検索でもできたしかし、85 症例の OCCCa で、LEFTY のスコアは overall survival、progression free survival、clinical stage、リンパ節転移などの臨床病理学的な要素との関連は見いだせなかった。

LEFTY1、2 の特異的プライマーを用いて、LEFTY 発現と OvCa の組織型の関係を検索すると、LEFTY1 の発現は、LEFTY2 よりも著明に高かった。OCCCa については、LEFTY1、LEFTY2 の発現は、mRNA およびタンパクレベルで non-OCCCa よりも著明に高かった。In situ hybridization にて OCCCa10 症例を検討すると、これらもまた LEFTY2 よりも LEFTY1 の発現が著明に高かった。LEFTY1 の mRNA レベルは、LEFTY 免疫染色の IHC score 高値・低値で分けたとき、正の相関関係が認められた。

LEFTY と TGF- β 1/Smad 経路との関連を調べるため、OCCCa の細胞株 (OVICE、TOV-21G) に TGF- β 1 処理をして検討した。コントロールとして、OEmCa の細胞株である Ishikawa も使用した (Ishikawa 細胞は、TGF- β 1 刺激によって LEFTY と pSmad2 の増加、それに伴って p21^{waf1}、p27^{kip1} の増加が認められたことを確認している)。OVICE と Ishikawa 細胞については、TGF- β 1 刺激によって pSmad2、LEFTY の発現増加が見られた。一方、TOV-21G では、この効果は弱かった。Smad2 の遺伝子導入あるいは TGF- β 1 刺激によって、LEFTY1、2 のプロモーター活性が Ishikawa 細胞において著明に増加したが、TOV-21G 細胞では認められなかった。臨床検体においては、LEFTY と pSmad2 の免疫染色は腫瘍内の同じ領域に染色が認められたが、IHC score は互いに関係が認められなかった。

OCCCa における、LEFTY 発現と細胞増殖の関連

OCCCa において LEFTY 発現が細胞増殖にどのように関連するか調べるため、二種類の独立した恒常的 LEFTY1 高発現細胞 (TOV-L1、ES-L1) を作製し検討した。その結果、どちらの細胞株も、細胞増殖能は抑制されていた。さらに、細胞周期開始から 6 時間後と 24 時間後で、TOV-L1 の p53 と p21^{waf1}、ES-L1 の p27^{kip1} は mock と比較して上昇しており、対照的に pSmad2 は低下していた。臨床検体の OCCCa 症例では、Ki-67 標識数 (LI; labeling indice) は LEFTY IHC score の低い症例に比較して、高い症例のほうが低値を示した。

LEFTY1 に特異的に結合する shRNA を用いて作製した 2 つの細胞株 (OV-shL1 #4、#5) において、mRNA とタンパク質ともに LEFTY は低下し、pSmad2 は増加した。また、増殖能は低下していた。一方、p53 の状態変化を伴わずに、p21^{waf1}、p27^{kip1} 発現は増加していた。

OCCCa における LEFTY 発現とアポトーシスの関連性

シスプラチン (CDDP) 処理を行った TOV-L1 細胞株は、生存能力の低下と sub-G1 期・G2/M 期の分画が増え、G1 期分画が減った。mock と比較すると、X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)、pSmad2、p27^{kip1} の発現低下、p53、bax、p21^{waf1}、cleaved caspase -3 の発現上昇が見られた。似たような結果は、ES-L1 細胞株でも見られた。2 つの細胞株において、CDDP 処理によって、Bcl2/bax 比もまた著明に低下していた。臨床検体では、OCCCa におけるアポトーシス細胞は、LEFTY 免疫染色に陽性であった。

アポトーシス数は、LEFTY 高発現症例のほうが、低発現症例よりも著明に多かった。

CDDP 処理をしない場合においても、mock と比較して OV-shL1 細胞ではアポトーシス細胞数は多かった。これと同時に、G1 期の分画も増えているが、CDDP 処理に反応するアポトーシス細胞数は、OV-shL1 のほうが明らかに低下した。XIAP、pSmad2、bcl2 の発現上昇も見られた。対照的に、細胞の生存能力は mock と TOV-L1 の間に差は認められなかった。これらの関係は、TUNEL 法においても観察された。

LEFTY による Smad2 依存 XIAP 発現の転写阻害

TGF- β 1 処理をした Ishikawa 細胞は、mRNA、タンパク質レベルともに XIAP 発現の上昇とともに、pSmad2 と LEFTY 発現も上昇した。TOV および ES において、XIAP のプロモーター活性は Smad2 導入により上昇したが、この効果は LEFTY1 導入を同時に行うことにより、無効化されて、内因性の XIAP mRNA 発現も低下していると考えられた。OCCCc 組織において、免疫染色で細胞質に XIAP 陽性の細胞は腫瘍内に不均一に存在し、pSmad2 陽性細胞とは局在が一致し、LEFTY とは一致しなかった。この結果は、OCCCc において、XIAP と pSmad2 が正の相関関係にあり、LEFTY とは相関しないことを示している。

[まとめ]

ショットガンプロテオミクス法や免疫染色、Western blot 法によって、OCCCc において LEFTY の高発現が認められた。OCCCc における mRNA 発現は LEFTY2 に比べて LEFTY1 のほうが高かった。

本研究において特記すべきは、LEFTY の過剰発現が OCCCc の抗腫瘍作用を示すことであり、これはおそらく LEFTY 過剰発現による TGF- β 1 の作用を抑制することによるものである。この結論は、OCCCc における、LEFTY 高発現症例での Ki-67 LI の数値などが裏付けしている。

以上、LEFTY は、OCCCc に特異的な分子マーカーで、増殖能とアポトーシス制御を介して抗腫瘍効果を示すと考えられる。